

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-245680

(43)Date of publication of application : 24.09.1996

(51)Int.Cl.

C07H 13/06  
C12P 19/44

(21)Application number : 07-077164

(71)Applicant : NATL FOOD RES INST

(22)Date of filing : 09.03.1995

(72)Inventor : TSUZUKI WAKAKO  
KOBAYASHI SHOICHI

## (54) CARBOHYDRATE-FATTY ACID COMPOSITE PRODUCED BY USING ORGANIC SOLVENT-SOLUBLE LIPASE AND ITS PRODUCTION

### (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject carbohydrate-fatty acid composite having excellent stability and useful for an emulsifier for food and a physical properties improver, etc., at a high yield by making an organic solvent-soluble lipase to act on a mixture of carbohydrate and fatty acid or oil and fat in the presence of an organic solvent.

CONSTITUTION: An organic solvent-soluble lipase is mixed with a carbohydrate such as monosaccharide, oligosaccharide, cyclodextrin and polysaccharide (e.g. glucose) and a mixture of a fatty acid such as a saturated fatty acid and an unsaturated fatty acid (e.g. palmitic acid) and/or an oil and fat such as a vegetable oil and an animal oil (e.g. soybean oil) in an organic solvent such as hexane, heptane, octane, isooctane, chloroform, ethyl acetate, acetone, benzene and petroleum ether, reacted in shaking at 37° C for 17hr, exsiccated in a reduced pressure at room temperature, separated into the resultant product and purified to obtain the objective carbohydrate-fatty acid composite (e.g. glucose-palmitate) having excellent stability and useful for an emulsifier for food and a physical properties improver, etc., in the field of a food, a medicine, a cosmetic and chemical industries, etc.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

09.03.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2913010

[Date of registration]

16.04.1999

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-245680

(43)公開日 平成8年(1996)9月24日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 13/06			C 0 7 H 13/06	
C 1 2 P 19/44			C 1 2 P 19/44	

審査請求 有 請求項の数6 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平7-77164

(22)出願日 平成7年(1995)3月9日

(71)出願人 591031360

農林水産省食品総合研究所長  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72)発明者 都築 和香子

茨城県つくば市吾妻2丁目3-2-706棟  
402号

(72)発明者 小林 昭一

茨城県土浦市乙戸南2丁目9番2号

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 有機溶媒可溶化リパーゼを用いて生産した糖質-脂肪酸複合体、及びその製造方法

(57)【要約】

【構成】 有機溶媒可溶化リパーゼを用いて生産した糖質-脂肪酸複合体並びに有機溶媒可溶化リパーゼを、有機溶媒中で糖質と脂肪酸及び／又は油脂の混合物に作用させることを特徴とする糖質-脂肪酸複合体の製造方法。

【効果】 本発明によれば、1糖質分子に1分子の脂肪酸が結合した複合体を効率よく生産でき、精製も容易である。さらに、通常のリパーゼでは有機溶媒中で反応させても、あるいは水溶液中で反応させても、収率は20%程度であるが、本発明の方法では収率が90%にも高まる。また、基質である糖質と脂肪酸及び／又は油脂の種類に限定はなく、組合せを選択すれば各種の複合体を生産することが可能である。さらに、本発明の方法で生産される複合体は脂肪酸、糖質いずれの部分も安定化され、食品用乳化材、物性改良剤等として利用できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 有機溶媒可溶化リパーゼを用いて生産した糖質－脂肪酸複合体。

【請求項2】 有機溶媒可溶化リパーゼを、有機溶媒中で糖質と脂肪酸及び／又は油脂の混合物に作用させることを特徴とする糖質－脂肪酸複合体の製造方法。

【請求項3】 糖質が、単糖、オリゴ糖、サイクロデキストリン及び多糖の中から選ばれたものである請求項2記載の製造法。

【請求項4】 脂肪酸が、飽和脂肪酸又は不飽和脂肪酸である請求項2記載の方法。

【請求項5】 油脂が、植物油又は動物油である請求項2記載の方法。

【請求項6】 ヘキサン、ヘプタン、オクタン、イソオクタン、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、ベンゼン及び石油エーテルよりなる群から選ばれた少なくとも1種の有機溶媒中でリパーゼを混合物に作用させる請求項2記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、有機溶媒可溶化リパーゼを用いて生産した糖質－脂肪酸複合体及びその製造方法に関し、詳しくは界面活性剤により有機溶媒に可溶性としたリパーゼを、有機溶媒中で糖質と脂肪酸及び／又は油脂の混合物に作用させることにより糖質－脂肪酸複合体を生成させ、有機溶媒を除去して得た該糖質－脂肪酸複合体及びその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 従来の糖質－脂肪酸複合体の製造法としては、化学合成法が主として用いられており、例えばグリセリン脂肪酸エステル、シュガーエステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステルなどがあるが、どれも化学合成品であることから、食品素材として利用する場合に不利であった。

【0003】 最近、欧州のある企業がリパーゼを用いてグルコース－脂肪酸エステルを生産したことが報告されている (Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E., and Kirk, O. (1991) *Tibtech* 9, 360-363) が、この方法は基質としてエチルグルコシドを用い、Molten acid を溶媒としているので、食品素材としての利用には不利であると考えられる。

【0004】 そこで、本発明者らは、上記の課題を解決すべく検討を重ね、水に不溶性で有機溶媒に溶解、有機溶媒中でも活性を保持しているリパーゼの調製方法を既に確立した。この方法で得られる有機溶媒可溶化リパーゼを用いることにより、どのような糖質と脂肪酸及び／

又は油脂からも糖質－脂肪酸複合体が得られることを見出し、本発明を完成した。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 すなわち、請求項1記載の本発明は、有機溶媒可溶化リパーゼを用いて生産した糖質－脂肪酸複合体である。また、請求項2記載の本発明は、有機溶媒可溶化リパーゼを、有機溶媒中で糖質と脂肪酸及び／又は油脂の混合物に作用させることを特徴とする糖質－脂肪酸複合体の製造方法である。

【0006】 有機溶媒可溶化リパーゼの調製には、界面活性剤のうち、特にジドデシルグルコシルグルタメイトを用いるが、本原料の成分は糖、高級アルコール及びアミノ酸であり、安価で大量に供給することが可能である。

【0007】 この界面活性剤を用いて、リパーゼをテトラヒドロフランを含む水溶液中で処理することによって、水に不溶性のリパーゼ複合体を調製することができる。その1例を次に示す。界面活性剤としてジドデシルグルコシルグルタメイトを用い、市販のリパーゼ（商品名：リパーゼP、天野製薬製）の粉末100mgを含む水溶液2mLと、界面活性剤400mgを含むテトラヒドロフラン溶液4mLを混合し、4℃で16時間激しく攪拌し、その後、溶液をエバポレーターで除去し、得られた沈澱に水を加えて2回洗浄して、未反応のタンパク質を除去し、一晚沈澱を凍結乾燥した。得られた界面活性剤－リパーゼ複合体粉末における活性の回収率は51.2%であったが、界面活性剤の添加量を増加させることにより、さらに回収率を高めることができる。該複合体は、4℃で1カ月以上保存しても失活せず、また有機溶媒中では極めて安定で2週間以上でも失活しない。

【0008】 市販のリパーゼにはこの他、各種の製品があり、また界面活性剤にも各種のものがあるが、これらを組み合わせて生産される有機溶媒可溶化リパーゼは勿論のこと、同様にして得られる有機溶媒可溶化エステラーゼも本発明に適用できる。さらに、サイクロデキストリン合成酵素、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼなど糖質関連酵素も、上記のようにして有機溶媒可溶化酵素とすることができ、これを用いて、本発明を適用して有機溶媒中で、糖質間、糖質－アルコール間などで縮合、合成反応させて各種の糖質や複合糖質等を生産できる。

【0009】 リパーゼの活性は、基質として4-メチルウンベリフェリルオレイトを用い、蛍光を測定して行った。その結果、リパーゼの活性は $12.1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ であった。

【0010】 有機溶媒可溶化リパーゼを用いる糖質－脂肪酸複合体の実際の合成は以下のようにして行った。

反応液組成：	グルコース	1 mg
	パルミチン酸	1.4 mg
	有機溶媒可溶化リパーゼ	10 mg

(蛋白質含量 1.2 mg)

全体を 1 ml のヘキサンに加えて懸濁液とし、37℃で振盪しながら反応を行い、反応液を経時的に 20  $\mu$ L 採取し、エバポレーターで蒸発乾固、100  $\mu$ L の HPLC 用溶媒を加えて溶解し、フィルター (DISMIC-3JP 0.5  $\mu$ m) で濾過し、濾液 20  $\mu$ L を HPLC で分析し、成分を定量した。

【0011】HPLC 条件は、カラム：Waters Bondapak-C<sub>18</sub>、検出装置：東京理化 EYELAPLC-5D (UV210nm で検出)、溶出：室温、溶媒：アセトニトリル/水 = 93/7、流速：1 mL/min であり、本条件下で、パルミチン酸の保持時間は 9.4 分、グルコース-パルミテートは 12.1 分であり、ピーク面積より生成率を計算した。本条件では、図 1 に示したように、12 時間程度で反応はほぼプラトーに達し、90%以上の収率であった。なお、図 1 中の●は有機溶媒可溶化リパーゼを用いた場合、■は通常のリパーゼ（無処理）を用いた場合を示している。図 2 は各種リパーゼを用いた場合の反応生成物を HPLC で分析した結果を示し、図 2 (B) は有機溶媒可溶化リパーゼを用いて 24 時間反応を行った場合の HPLC による成分分析例を示したものである。反応時間を延長すると、3 の成分が増大してくる。また、図 2 (A) は通常のリパーゼ（無処理）を用いて同様に反応させた場合の溶出パターンを示したものである。図 2 中の各ピークの記号は、S がソルベント、C が有機溶媒可溶化リパーゼ、1 がパルミチン酸、2 が複合体（グルコース-パルミテート）、3 がグルコース-ジパルミテートである。

【0012】糖質としては、グルコースの他に、アラビノース、キシロース、フルクトース、ガラクトース、マンノースなどの単糖、マルトース、ショ糖、マルトリオース、パノース、ラクトスクロース、テアンドロースなど各種のオリゴ糖、澱粉、デキストラン、イヌリン、寒天、グルコマンナンなど各種の多糖がある。また、本発明では糖質として、グリセリン、エリスリトール、キシリトール、ソルビトールなどの糖アルコールも含める。また、サイクロデキストリンとしては、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -サイクロデキストリン、大環状サイクロデキストリンの他、これらに置換基が導入された分岐サイクロデキストリンも用いられる。

【0013】次に、脂肪酸としては各種のものがあ、例えばカプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸などの飽和脂肪酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、DHA、EPA などの不飽和脂肪酸などがある。これら脂肪酸の他に、油脂を用いることができ、大豆油、なたね油、ヒマワリ油、ベニハナ油、コーン油などの植物油や魚油、鯨油などの動物油が利用できる。この他、例えば酢酸、クエン酸等の有機酸などのカルボキシル基をもつものであれば、何れでも本発明の方法を適用できる可能

性がある。

【0014】本発明によれば、有機溶媒中で前記有機溶媒可溶化リパーゼをこれらに作用させることによって、グルコース-パルミテート、マルトース-パルミテート、スクロース-パルミテート、グルコース-DHA など各種の複合体が生産でき、特に糖質と不飽和脂肪酸との複合体は安定性に優れたものになる。

【0015】エリスリトールの場合、脂肪酸は C 1 位に結合したものが主として生成し、ソルビトールでも C 1 または C 6 位に結合した複合体が主として生成する。

【0016】また、グルコースのポリマーを基質とした場合、マルトース、マルトリオースまでは、90%以上の収率で C 6 位に脂肪酸が 1 分子当たり 1 分子結合した複合体が得られるが、反応条件を強化すると、僅かながら糖質 1 分子に 2 分子以上の脂肪酸が結合した成分も認められた。マルトテトラオースからマルトヘプタオースのように糖基質の重合度が増すに従い、糖質 1 分子に 2 分子以上の脂肪酸が結合した複合体の生成量は増加する。

【0017】単糖又はオリゴ糖と脂肪酸との複合体は、反応終了後、清澄な有機溶媒部分を取り出し、温水または熱水抽出すれば得られる。また、未反応油脂との分離は、極性の異なる溶媒系で分別することにより行うことが可能である。

【0018】澱粉粒のような多糖でも、同様に反応させて、ヘキサンで数回洗浄した後、乾燥して脂肪酸結合多糖を調製することができる。結合した脂肪酸量を合成条件の 100 倍希釈で元のリパーゼ P (商品名) を反応させ、遊離した脂肪酸を HPLC で定量して求めた結果、結合量は 5%程度であるが、澱粉の物性変化が期待できる。

【0019】工業的な製造法の場合には、基質濃度をさらに高め、有機溶媒可溶化リパーゼを固定化して用いる方法が望ましい。

【0020】また、基質の混合比は通常は 1 : 1 分子になるように調整すればよいが、脂肪酸又は油脂は有機溶媒中に溶解するので、大過剰に加えれば、糖質に対する収率は効果的に増大する。生成する複合体が有機溶媒に溶解し難い場合は、反応生成物を取り出して、糖質を加える連続的生産が可能となる。

【0021】通常反応では複合体主成分が 90%以上を占めるので、精製は容易である。しかし、実用的には未反応油脂との混合物の状態でも利用できる。また、精製品は食品以外、例えば医薬、化粧品、化学工業分野等でも目的に応じて利用できる可能性がある。

【0022】本発明に用いる有機溶媒としては、通常ヘキサンが使用されるが、本発明で用いるリパーゼが溶解するものであれば種類を限定せずに各種の有機溶媒を用いることができる。水と混合しない溶媒系であれば、生

成物は水と振盪して水層に移すことができるので便利であり、酵素を含む溶媒系は繰り返し利用することができる。本発明ではヘキサン他にクロロホルム、ベンゼン、石油エーテル、ヘプタン、オクタン、イソオクタン、酢酸エチル、アセトンなどの有機溶媒の使用も可能であり、これらの中から2種以上の溶媒を混合して用いることもできる。

#### 【0023】

【実施例】次に、本発明を実施例により説明する。なお、実施例での収率は加えた脂肪酸から換算した値であり、脂肪酸又は油脂を大過剰量加えた場合は、何れの場合でも加えた糖質を100とした時の、糖質-脂肪酸複合体生成率は90%以上となった。

#### 実施例1

グルコース(1mg)、パルミチン酸(1.4mg)、有機溶媒可溶化リパーゼ(10mg、蛋白質含量1.2mg)を1mLのオクタンに混合し、37℃で17時間、振盪反応した後、室温で減圧乾固し、アセトニトリル/水=93/7を5mL加えて溶解し、濾過した後、HPLCで分析した結果、92%の収率でグルコース-パルミテートが得られた。

#### 【0024】実施例2

オクタンの代わりに石油エーテルを用いた以外は実施例1と同様にして90%の収率でグルコース-パルミテートが得られた。

#### 【0025】実施例3

オクタンの代わりにヘキサン、グルコースの代わりにガラクトースを用いた以外は実施例1と同様にして91%の収率でガラクトース-パルミテートが得られた。

#### 【0026】実施例4

ガラクトースの代わりにソルビトール、パルミチン酸の代わりにステアリン酸を用いた以外は実施例3と同様にして84%の収率でソルビトール-ステアレートが得られた。

#### 【0027】実施例5

マルトース(2mg)とヘキサンを用いた以外は実施例1と同様にして87%の収率でマルトース-パルミテートが得られた。なお、本生成物を0.01%の濃度に水に溶かし、未処理リパーゼに作用させると、マルトースとパルミチン酸がモル等量生成することから、1:1に結合した複合体であり、NMR分析から1,6結合した糖質アセテートであることが認められた。

#### 【0028】実施例6

ショ糖を用いた以外は実施例5と同様にして91%の収率でショ糖-パルミテートが得られた。

#### 【0029】実施例7

マルトテトラオース(4mg)を用いた以外は実施例5と同様にしてマルトテトラオース-パルミテートを98%の収率で得た。

#### 【0030】実施例8

マルトヘキサオース(6mg)を用いた以外は実施例5と同様にしてマルトヘキサオース-パルミテートを97%の収率で得た。なお、ジパルミテート、トリパルミテートなどを得るには、糖質分子に対して2倍、3倍等の脂肪酸成分を加え、反応を強化すればよい。

#### 【0031】実施例9

$\alpha$ -CD(5mg)、DHA(1.7mg)、有機溶媒可溶化リパーゼ(10mg、蛋白質含量1.2mg)を1mLのヘキサンに混合し、37℃で24時間、振盪反応した後、室温で減圧乾固し、アセトニトリル/水=93/7を5mL加えて溶解し、濾過した後、HPLCで分析した結果、64%の収率でCD-DHA複合体が得られた。なお、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CDを各々6mg、7mgを加えた場合でも60%程度の収率であった。

#### 【0032】実施例10

$\alpha$ -CDの代わりにグルコシル- $\alpha$ -CD(4.5mg)、DHAの代わりにパルミチン酸(1mg)を用いた以外は実施例9と同様にして96%の収率でグルコシル- $\alpha$ -CD-パルミテートを得た。NMRによる分析結果ではグルコースの枝部分のC6位にパルミチン酸が結合した構造の複合体が主成分であった。分岐CDとしてグルコシル-、マルトシル- $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CDでも同様の結果が得られた。

#### 【0033】実施例11

グルコースの代わりにトウモロコシ澱粉(20mg)、オクタンの代わりにヘキサンを用いた以外は実施例1と同様にして澱粉-パルミチン酸複合体を2%の収率で得た。なお、収率は本実施例で得られた複合体を水に懸濁し、未処理リパーゼを反応させ、遊離した脂肪酸の量と未反応の脂肪酸量から計算して求めた。

#### 【0034】実施例12

トウモロコシ澱粉の代わりに市販「アビセル」セルロース(20mg)を用いた以外は実施例11と同様にしてセルロース-パルミチン酸複合体を5%の収率で得た。

#### 【0035】実施例13

ショ糖(2mg)と大豆油(1.6mg)及び有機溶媒可溶化リパーゼ(10mg、蛋白質含量1.2mg)を1mLのヘキサンに混合し、37℃で24時間振盪反応した後、室温で減圧乾固し、アセトニトリル/水=93/7を5mL加えて溶解し、濾過した後、HPLCで分析した結果、各種ショ糖-脂肪酸複合体が得られ、複合体の構成比はパルミチン酸を含むもの9%、ステアリン酸を含むもの3%、オレイン酸を含むもの21%、リノール酸を含むもの56%、リノレン酸を含むもの8%であった。なお、構成比は大豆油を未処理リパーゼに作用させて分解して得られる遊離脂肪酸の全体量を100とした時の各脂肪酸複合体に含まれる量比(%)で表した。

#### 【0036】実施例14

大豆油の代わりになたね油(1.6mg)を用いた以外

は実施例 13 と同様にして構成比でパルミチン酸 4 %、ステアリン酸 1 %、オレイン酸 55 %、リノール酸 22 %、リノレン酸 11 % を含む組成の複合体が得られた。

#### 【0037】実施例 15

大豆油の代わりに市販魚油を用いた以外は実施例 13 と同様にしてミリスチン酸 7 %、パルミチン酸 19 %、ヘキサデセン酸 9 %、オレイン酸 15 %、エイコサペンタエン酸 20 %、ドコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸 14 % を含む組成の複合体が得られた。

#### 【0038】

【発明の効果】本発明の方法によれば、有機溶媒可溶化リパーゼを用いることにより糖質に脂肪酸を効率的に結合して各種の糖質-脂肪酸複合体を生成させることができる。しかも、本発明で生産される複合体は、反応条件を適切に選択すれば、ほぼ 90 % 以上の収率で 1 糖質分子に 1 分子の脂肪酸が結合した複合体が生産でき、精製も容易であり、純品を得易いという利点もある。

【0039】さらに、本発明の方法では、有機溶媒中で反応を行うので、加水分解反応は殆ど起こらず、糖質を選ばずに極めて効率的に反応が進行する。また、糖質に限らずアルコール性の水酸基をもつ物質とカルボキシル基をもつ物質であれば、本発明と同様の反応が起こり、例えばセルロースとクエン酸のような糖質と有機酸の組合せ、グルコースとグルタミン酸のような糖質とアミノ酸の組合せ、糖質と安息香酸、没食子酸などの組合せの複合体があり、特にセルロースと有機酸の組合せでゲル

用複合体が生産できる。

【0040】一方、遊離脂肪酸のみならず、各種油脂を用いることもできるので、経済的であり、これら複合体は、混合した状態でも商品化でき、乳化能があることから、天然の新しい乳化剤としての利用が考えられる。さらには、乳化剤としてのみならず、物性変換素材として各種の食品への利用も可能である。また、糖質基質として、オリゴ糖や多糖を選択することにより、油脂の粉末化も可能である。

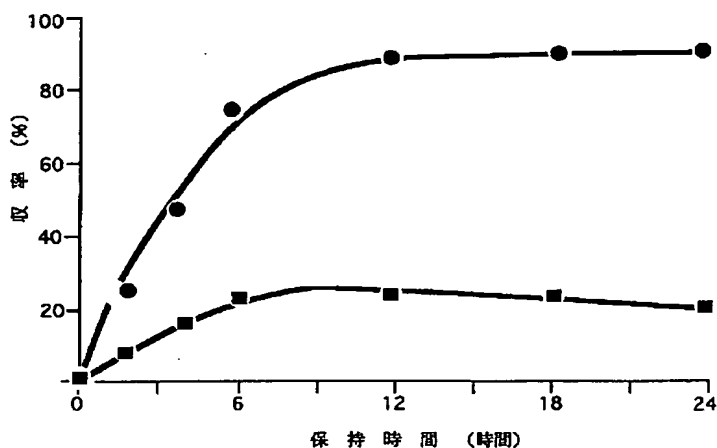
【0041】本発明の方法で不飽和脂肪酸を複合体にした場合、酸化に対して安定性を付与することも可能であり、安定化して使用範囲を広げることができるので、各種食品素材と混合して用いることもできる。また、逆に糖質部分も脂肪酸を付けることにより、 $\alpha$ -アミラーゼなど糖質分解酵素の作用に対して抵抗性を付与することも可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 グルコースとパルミチン酸を混合し、ヘキサン中で 37℃、攪拌反応させた時の複合体（グルコース-パルミテート）の収率を表す曲線である。

【図 2】 脂肪酸と複合体（グルコース-パルミテート）の高速液体クロマトグラフィーによる分析例を示したもので、(A) は通常のリパーゼ（無処理）を用いた場合を、(B) は有機溶媒可溶化リパーゼを用いた場合を示す。

【図 1】



【図2】

